

(12) NACH DEM VEREINBAR ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



527737

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. April 2004 (15.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/030639 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 7/00, (FR). PAULY, Gilles [FR/FR]; 5, rue de Begonias, F-54000 Nancy (FR).
7/48, 38/39
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009809 (74) Anwalt: FABRY, Bernd; Cognis Deutschland GmbH & Co. KG, Postfach 13 01 64, 40551 Düsseldorf (DE).
- (22) Internationales Anmeldedatum:
4. September 2003 (04.09.2003) (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, KR, US.
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
02292247.0 13. September 2002 (13.09.2002) EP Erklärung gemäß Regel 4.17:
— Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): COGNIS FRANCE S.A. [FR/FR]; Boussens, F-31360 Saint-Martory (FR). Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): JEANMAIRE, Christine [FR/FR]; 34, avenue de la Garenne, F-54000 Nancy
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PROTECTING AND FOR MODULATING DERMAL-EPIDERMAL JUNCTIONS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM SCHUTZ UND ZUR MODULATION VON DERMAL EPIDERMAL JUNCTIONS

(57) Abstract: The invention relates to a method for cosmetically treating and improving and/or protecting dermal-epidermal junctions of the skin, scalp and mucous membranes. This method is characterized in that a preparation containing at least one substance, which effects a modulation of plectin/HD1 and/or entactin/nidogen and/or perlecan is topically applied. The invention also relates to the use of a substance, which effects a modulation of plectin/HD1 and/or entactin/nidogen and/or perlecan, for producing cosmetic agents for improving dermal-epidermal junctions of the skin, scalp and mucous membranes, to the use of this substance for producing cosmetic agents for protecting against aging of the skin and oxidative stress, and to the use of this substance for producing cosmetic agents for protecting against damaging influences of environmental toxicants and UV radiation.

(57) Zusammenfassung: Vorgeschlagen wird ein Verfahren zur kosmetischen Behandlung zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal-Epidermal-Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Zubereitung, enthaltend mindestens eine Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, topisch aufträgt. Des Weiteren wird die Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zur Verbesserung der Dermal Epidermal Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut und die Verwendung dieser Substanz zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz gegen Hautalterung, oxidativen Stress und die Verwendung der Substanz zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz gegen schädigende Einflüsse durch Umweltgifte und UV-Strahlung vorgeschlagen.

WO 2004/030639 A1

Verfahren zum Schutz und zur Modulation von Dermal Epidermal Junctions

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung befindet sich auf dem Gebiet der kosmetischen Zubereitungen und betrifft ein kosmetisches Verfahren zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal-Epidermal Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut und zum Schutz der menschlichen Haut gegen die Alterung, oxidativen Stress und gegen schädigende Einflüsse durch Umweltgifte und UV-Strahlung. Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal Epidermal Junctions.

Stand der Technik

Die Basalmembran ist eine verbindende Zellstruktur zwischen morphologisch unterschiedlichen Geweben. In der Haut befindet sie sich im wesentlichen als Blutgefäße umschließendes Gewebe und zwischen Dermis und Epidermis. Die letztgenannte Region trennt die Epidermis und ihre Anhanggebilde von der Dermis und wird entsprechend als Dermal-Epidermal-Junction (DEJ) bezeichnet. Die DEJ besitzt eine komplexe Struktur bestehend aus Hemidesmosomen, intermediären Filamenten, verankernden Filamenten, Lamina densa und verankernden Fibrillen. Zu den darin hauptsächlich vorkommenden biochemischen Komponenten zählen Laminin-5 in der Lamina lucida; die Antigene AgBP 230 und AgPB180 sowie Plectin/HD1 in Hemidesmosomen; Entactin/Nidogen und das Proteoglykan Perlecan in der Lamina lucida und Lamina densa; Collagen Typ IV in der Lamina densa und das Proteoglykan Collagen Typ VII als Bestandteil der verankernden Fibrillen in der sub-Lamina densa. Diese Komponenten bilden ein interagierendes Netzwerk.

Die DEJ stellt das wichtigste Gebilde der Haut dar. Sie sorgt für die Verbindung zwischen Epidermis und darunter liegender Dermis und erhält die Integrität des epithelialen Gewebes durch Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix über die speziellen verbindenden Zellkomplexe der Hemi-Desmosomen, Filamente und Fibrillen.

Einerseits stellt sie einen Filter für den Fluss spezieller Moleküle dar, andererseits ermöglicht sie den Austausch von Informationen – beispielsweise über Wachstumsfaktoren - zwischen Keratinocyten und Dermis.

Zu den alterungsbedingten Änderungen der DEJ zählen die abnehmende Dicke der Junctions und die Reduktion von den aus basalen Keratinocyten bestehenden cytoplasmatischen Zellzotten in der Dermis. Die dadurch resultierende Abnahme der Oberfläche der DEJ führt zu einem reduzierten Widerstand des Gewebes, einer Abnahme der Hautstraffung und einer vermehrten Bildung von Falten. Weitere Alterungserscheinungen wie Verdopplung der Lamina densa, Alterung der verankernden Fibrillen oder Modifikationen von Zellkomponenten der DEJ führen ebenfalls dazu, dass die Verankerung über das epidermale System mit zunehmendem Alter eine Lockerung erfährt. Die bei der Alterung bedingte Abnahme von Typ VII Collagen erklärt man sich auch durch die Hydrolyse des Collagens über Metalloproteinasen. Typ VII Collagen scheint mit zunehmendem Alter weniger resistent gegen Proteasen zu sein.

Auch durch UV-Strahlung induzierte Schädigungen, die zu einer Reduktion des Gehaltes an Typ VII Collagen in den verankernden Fibrillen führen, resultieren in einer Lockerung der Bindung zwischen Dermis und Epidermis und einer dadurch bedingten Abnahme der Hautelastizität und Zunahme von Falten.

Zahlreiche Krankheiten, die die DEJ beeinträchtigen, führen zu einer Ausbildung von subepidermalen Umfangsvermehrungen. Sie zeigen als gemeinsames Merkmal eine verminderte Cohesion zwischen Dermis und Epidermis, die sich auf der Ebene der DEJ in einer Bildung von Einbuchtungen manifestiert.

Mit dem Ziel einer Verbesserung der Funktion der Dermal Epidermal Junctions wurden insbesondere Bestandteile der DEJ wie Lamin (FR 2813018, WO 97/48415), oder Kalinin (WO 92/ 17498) in kosmetischen und dermatologischen Formulierungen eingesetzt. Auch die Stimulation von Typ IV Collagen durch Magnesiumaspartat (WO 99/62481), Saponine (FR 2779058) oder Pflanzenextrakte (EP 668072) sowie die Stimulation von Typ VII Collagen durch Elaginsäure (WO 99/16415), Pflanzenextrakt der *Potentilla erecta* (WO 98/19664) oder *Bertholletia* Extrakt (US 6004568) wurden offenbart zur Herstellung von kosmetischen Zubereitungen gegen Alterung, Faltenbildung und zur Straffung der Haut.

Dennoch besteht weiterer Bedarf an einem effektiven Schutz der Haut gegen umweltbedingte Alterungseinflüsse. Die Aufgabe der vorliegenden Patentanmeldung hat daher darin bestanden, neue Mechanismen zur Verbesserung der Dermal-Epidermal Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut zu finden, die zu einer Verzögerung der Hautalterung und zu einem Schutz der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut gegen Umwelteinflüsse, oxidativen Stress, toxische Substanzen oder UV-Strahlung beitragen und somit effektiv in kosmetischen Zubereitungen für die topische Anwendung genutzt werden können.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur kosmetischen Behandlung zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal-Epidermal Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Zubereitung, enthaltend mindestens eine Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, topisch aufträgt.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind die Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal-Epidermal Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut, die Verwendung dieser Substanz zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz gegen Hautalterung und die Verwendung der Substanz zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz gegen oxidativen Stress, schädigende Einflüsse durch Umweltgifte und UV-Strahlung.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Modulation von Molekülen wie Plectin/HD1, Entactin/Nidogen und/oder Perlecan zu einer Erhaltung und Verbesserung der Dermal-Epidermal-Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut führt. Die Funktion der DEJ ist eine essentielle Voraussetzung nicht nur für die Gesundheit, sondern auch für die Kosmetik. Sie sorgt für einen guten Zusammenhalt zwischen Epidermis und den darunter liegenden Geweben der Dermis, erhält somit die Elastizität und Straffheit der Haut und ermöglicht die Verhinderung von Faltenbildung. Darüber hinaus wird über die DEJ einerseits die gute Versorgung der Haut durch die Passage von lebensnotwendigen Molekülen zwischen Epidermis und Dermis gewährleistet, andererseits ein Schutz vor dem Eindringen schädigender Moleküle in tiefere Hautschichten geboten.

Die Modulation von Plectin/HD1, Entactin/Nidogen und/oder Perlecan über die topische Applikation einer Zubereitung, die diese Substanzen stimuliert, hat nun gezeigt, dass auf diese Weise die Dermal Epidermal Junction resp. das gesamte komplexe Netzwerk der DEJ gestärkt werden kann. Dieses hat eine Straffung der Haut und Verminderung der Faltenbildung zur Folge. Durch die verbesserte Verankerung zwischen den Komponenten der DEJ und die damit verbundene erhöhte Stabilität und zunehmende Elastizität des Gewebes können Alterungserscheinungen, auch wenn sie durch UV-Strahlung verursacht sind, effektiv vorgebeugt werden.

Bedingt durch die Verbesserung der Molekülpassagefunktion wird der Austausch zwischen Keratinocyten und Dermis und die Ernährung der Haut optimiert, und somit nicht nur die Haut gegen Alterung, sondern auch gegen schädigende Einflüsse von UV-Strahlung und toxischen Umwelteinflüssen geschützt, da durch die verbesserte Versorgung auch die Abwehr gegen schädigende Moleküle gestärkt wird.

Die DEJ umgibt auf der Kopfhaut die Haarfollikel und sorgt auch hier für einen Schutz der Follikel, so dass eine Stärkung der DEJ in diesem Bereich zu einer Verbesserung der Haareigenschaften führt und insbesondere wirksam ist gegen Haarausfall oder Haarschädigungen.

Somit haben die topisch applizierten kosmetischen Mittel, die mindestens eine Substanz enthalten, welche die Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, einen vorbeugenden Effekt gegen Hautalterung und schädigende Einflüsse durch oxidativen Stress, Umweltgifte und UV-Strahlung auf Haut, Kopfhaut, Haare und Schleimhaut. Die Modulation der speziellen Moleküle führt jedoch neben der vorbeugenden Wirkung auch zu einer beschleunigten Regeneration der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut nach einer bereits eingetretenen Schädigung.

Als Modulatoren haben sich Pflanzenextrakte, insbesondere der Extrakt aus *Pisum sativum*, *Ruscus Aculeatus*, *Centella asiatica*, *Calendula Officinalis*, *Aesculus Hippocastanum*, und/oder *Hibiscus esculentus* als geeignet erwiesen. Möglich ist jedoch auch eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan über die Gabe von niedrigmolekularen Peptiden, die zum Aufbau der DEJ-Komponenten benötigt werden und eine ähnliche Sequenz aufweisen wie Bestandteile von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan.

Ebenfalls beobachtet wurde eine Modulation der Moleküle über mindestens eine Substanz, die ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird von Mannitol, Cyclodextrin, Hefeextrakt, Panthenol, Propylen Glycol, Ammonium Glycyrrhizat und Dinatriumsuccinat. Insbesondere die Kombination dieser Bestandteile trägt zu einer vorteilhaften Wirkung auf die Dermal-Epidermal Junctions bei.

Da die DEJ für den Abbau durch eine Vielzahl unterschiedlicher Proteasen sehr empfänglich ist, trägt die Verwendung von Pflanzenextrakten, Peptiden und anderen Wirkstoffen mit Anti-Protease Aktivität entscheidend zum Erhalt der Struktur bei. Wirkstoffe mit Anti-Protease Aktivität können in Kombination mit Substanzen, welche die Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirken, zu einer überdurchschnittlichen Wirkungssteigerung beitragen.

Neben diesen Substanzen oder Pflanzenextrakten können die kosmetischen Mittel außerdem UV-Lichtschuttfaktoren und/oder Antioxidantien enthalten. Die Kombination aus Substanzen, die eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirken mit UV-Lichtschuttfaktoren und/oder Antioxidantien führt durch die unterschiedlichen Mechanismen zu einer synergistischen Wirkungsweise und bietet einen hervorragenden Schutz gegen schädigende Einflüsse und Hautalterung durch UV-Lichteinwirkung.

Plectin/HD1

Plectin und HD1 sind Synonyme für das selbe Molekül. Es ist in den Hemi-Desmosomen lokalisiert, weist eine Molekülmasse von ca. 500 Dalton auf und dient der Verankerung von Proteinen des Cytoskellets wie Keratin, Vimentin oder Proteinen der Microtubuli.

Entactin/Nidogen

Auch Entactin und Nidogen sind unterschiedliche Begriffe für das selbe Molekül. Es stellt ein Glycoprotein mit einer Molekülmasse von ungefähr 150 Dalton dar, das aus zwei terminalen globulären Regionen, die durch eine langkettige Struktur miteinander verbunden sind, besteht. Dieses Glycoprotein ist maßgeblich für die strukturelle Stabilität der DEJ verantwortlich, dadurch dass es eine Verbindung zwischen Laminin und Typ IV Collagen herstellt und zur Verankerung einer Vielzahl weiterer Komponenten wie Fibulin oder Perlecan beiträgt.

Perlecan

Alle Basalmembranen enthalten Proteoglycane. Das hauptsächlich in der DEJ vorkommende Proteoglycan ist Perlecan, ein Heparansulfat, das von dermalen Fibroblasten synthetisiert wird. Perlecan besteht aus einem großen Proteinkern und drei Heparansulfatketten. Seine Aufgabe ist es unter anderem eine Bindung zwischen Laminin-6 und Nidogen zu stabilisieren. Neben den verankernden Funktionen binden Heparansulfat-Proteoglykane auch diffundierende Moleküle wie Enzyme und Wachstumsfaktoren und haben möglicherweise dadurch ebenfalls einen Einfluss auf das Verhalten und die Eigenschaften von Zellen.

UV-Lichtschutzfilter und Antioxidantien

Unter UV-Lichtschutzfaktoren sind beispielsweise bei Raumtemperatur flüssig oder kristallin vorliegende organische Substanzen (Lichtschutzfilter) zu verstehen, die in der Lage sind, ultraviolette Strahlen zu absorbieren und die aufgenommene Energie in Form längerwelliger Strahlung, z.B. Wärme wieder abzugeben. UVB-Filter können öllöslich oder wasserlöslich sein. Als öllösliche Substanzen sind z.B. zu nennen:

- 3-Benzylidencampher bzw. 3-Benzylidennorcampher und dessen Derivate, z.B. 3-(4-Methylbenzyliden)campher;
- 4-Aminobenzoesäurederivate, vorzugsweise 4-(Dimethylamino)benzoesäure-2-ethylhexylester, 4-(Dimethylamino)benzoesäure-2-octylester und 4-(Dimethylamino)benzoesäureamylester;

- Ester der Zimtsäure, vorzugsweise 4-Methoxyzimtsäure-2-ethylhexylester, 4-Methoxyzimtsäurepropylester, 4-Methoxyzimtsäureisoamylester 2-Cyano-3,3-phenylzimtsäure-2-ethylhexylester (Octocrylene);
- Ester der Salicylsäure, vorzugsweise Salicylsäure-2-ethylhexylester, Salicylsäure-4-isopropylbenzylester, Salicylsäurehomomenthylester;
- Derivate des Benzophenons, vorzugsweise 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, 2-Hydroxy-4-methoxy-4'-methylbenzophenon, 2,2'-Dihydroxy-4-methoxybenzophenon;
- Ester der Benzalmalonsäure, vorzugsweise 4-Methoxybenzmalonsäuredi-2-ethylhexylester;
- Triazinderivate, wie z.B. 2,4,6-Triänilino-(p-carbo-2'-ethyl-1'-hexyloxy)-1,3,5-triazin und Octyl Triazon, oder Dioctyl Butamido Triazone (Uvasorb® HEB);
- Propan-1,3-dione, wie z.B. 1-(4-tert. Butylphenyl)-3-(4'-methoxyphenyl)propan-1,3-dion;
- Ketotricyclo(5.2.1.0)decan-Derivate.

Als wasserlösliche Substanzen kommen in Frage:

- 2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure und deren Alkali-, Erdalkali-, Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und Glucammoniumsalze;
- Sulfonsäurederivate von Benzophenonen, vorzugsweise 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenon-5-sulfonsäure und ihre Salze;
- Sulfonsäurederivate des 3-Benzylidencamphers, wie z.B. 4-(2-Oxo-3-bornylidenmethyl)benzolsulfonsäure und 2-Methyl-5-(2-oxo-3-bornyliden)sulfonsäure und deren Salze.

Als typische UV-A-Filter kommen insbesondere Derivate des Benzoylmethans in Frage, wie beispielsweise 1-(4'-tert. Butylphenyl)-3-(4'-methoxyphenyl)propan-1,3-dion, 4-tert.-Butyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol® 1789), 1-Phenyl-3-(4'-isopropylphenyl)propan-1,3-dion sowie Enaminverbindungen. Die UV-A und UV-B-Filter können selbstverständlich auch in Mischungen eingesetzt werden. Besonders günstige Kombinationen bestehen aus den Derivate des Benzoylmethans, z.B. 4-tert.-Butyl-4'-methoxydibenzoylmethan (Parsol® 1789) und 2-Cyano-3,3-phenylzimtsäure-2-ethylhexylester (Octocrylene) in Kombination mit Ester der Zimtsäure, vorzugsweise 4-Methoxyzimtsäure-2-ethylhexylester und/oder 4-Methoxyzimtsäurepropylester und/oder 4-Methoxyzimtsäureisoamylester. Vorteilhaft werden dergleichen Kombinationen mit wasserlöslichen Filtern wie z.B. 2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure und deren Alkali-, Erdalkali-, Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und Glucammoniumsalze kombiniert.

Neben den genannten löslichen Stoffen kommen für diesen Zweck auch unlösliche Lichtschutzpigmente, nämlich feindisperse Metalloxide bzw. Salze in Frage. Beispiele für geeignete

te Metalloxide sind insbesondere Zinkoxid und Titandioxid und daneben Oxide des Eisens, Zirkoniums, Siliciums, Mangans, Aluminiums und Cers sowie deren Gemische. Als Salze können Silicate (Talk), Bariumsulfat oder Zinkstearat eingesetzt werden. Die Oxide und Salze werden in Form der Pigmente für hautpflegende und hautschützende Emulsionen und dekorative Kosmetik verwendet. Die Partikel sollten dabei einen mittleren Durchmesser von weniger als 100 nm, vorzugsweise zwischen 5 und 50 nm und insbesondere zwischen 15 und 30 nm aufweisen. Sie können eine sphärische Form aufweisen, es können jedoch auch solche Partikel zum Einsatz kommen, die eine ellipsoide oder in sonstiger Weise von der sphärischen Gestalt abweichende Form besitzen. Die Pigmente können auch oberflächenbehandelt, d.h. hydrophilisiert oder hydrophobiert vorliegen. Typische Beispiele sind gecoatete Titandioxide, wie z.B. Titandioxid T 805 (Degussa) oder Eusolex® T2000 (Merck). Als hydrophobe Coatingmittel kommen dabei vor allem Silicone und dabei speziell Trialkoxyoctylsilane oder Simethicone in Frage. In Sonnenschutzmitteln werden bevorzugt sogenannte Mikro- oder Nanopigmente eingesetzt. Vorzugsweise wird mikronisiertes Zinkoxid verwendet.

Neben den beiden vorgenannten Gruppen primärer Lichtschutzstoffe können auch sekundäre Lichtschutzmittel vom Typ der Antioxidantien eingesetzt werden, die die photochemische Reaktionskette unterbrechen, welche ausgelöst wird, wenn UV-Strahlung in die Haut eindringt. Typische Beispiele hierfür sind Aminosäuren (z.B. Glycin, Histidin, Tyrosin, Tryptophan) und deren Derivate, Imidazole (z.B. Urocaninsäure) und deren Derivate, Peptide wie D,L-Carnosin, D-Carnosin, L-Carnosin und deren Derivate (z.B. Anserin), Carotinoide, Carotine (z.B. α -Carotin, β -Carotin, Lycopin) und deren Derivate, Chlorogensäure und deren Derivate, Liponsäure und deren Derivate (z.B. Dihydroliponsäure), Aurothioglucose, Propylthiouracil und andere Thiole (z.B. Thioredoxin, Glutathion, Cystein, Cystin, Cystamin und deren Glycosyl-, N-Acetyl-, Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Amyl-, Butyl- und Lauryl-, Palmitoyl-, Oleyl-, γ -Linoleyl-, Cholesteryl- und Glycerylester) sowie deren Salze, Dilaurylthiodipropionat, Distearylthiodipropionat, Thiodipropionsäure und deren Derivate (Ester, Ether, Peptide, Lipide, Nukleotide, Nukleoside und Salze) sowie Sulfoximinverbindungen (z.B. Buthioninsulfoximine, Homocysteinsulfoximin, Butioninsulfone, Penta-, Hexa-, Heptathioninsulfoximin) in sehr geringen verträglichen Dosierungen (z.B. pmol bis μ mol/kg), ferner (Metall)-Chelatoren (z.B. α -Hydroxyfettsäuren, Palmitinsäure, Phytinsäure, Lactoferrin), α -Hydroxysäuren (z.B. Citronensäure, Milchsäure, Äpfelsäure), Huminsäure, Gallensäure, Gallenextrakte, Bilirubin, Biliverdin, EDTA, EGTA und deren Derivate, ungesättigte Fettsäuren und deren Derivate (z.B. γ -Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure), Folsäure und deren Derivate, Ubichinon und Ubichinol und deren Derivate, Vitamin C und Derivate (z.B. Ascorbylpalmitat, Mg-Ascorbylphosphat, Ascorbylacetat), Tocopherole und Derivate (z.B. Vitamin-E-acetat), Vitamin A und Derivate (Vitamin-A-palmitat) sowie Koniferylbenzoat des Benzoeharzes, Rutinsäure und deren Derivate, α -Glycosylrutin, Ferulasäure, Furfurylidenglucitol, Carnosin, Butylhydroxy-

toluol, Butylhydroxyanisol, Nordihydroguajakharzsäure, Nordihydroguajaretsäure, Trihydroxybutyrophenon, Harnsäure und deren Derivate, Mannose und deren Derivate, Superoxid-Dismutase, Zink und dessen Derivate (z.B. ZnO , ZnSO_4) Selen und dessen Derivate (z.B. Selen-Methionin), Stilbene und deren Derivate (z.B. Stilbenoxid, trans-Stilbenoxid) und die erfindungsgemäß geeigneten Derivate (Salze, Ester, Ether, Zucker, Nukleotide, Nukleoside, Peptide und Lipide) dieser genannten Wirkstoffe.

Beispiele

Beispiel 1: Plectin Expression

Reagentien:

Monoklonale Antikörper anti-plectin und sekundäre Antikörper an Fluorescein Isothiocyanat FITC konjugierte anti-mouse Antikörper IgG wurden erhalten von der Firma Tebu und Clinisciences. PBS (Phosphat buffered saline pH 7,2) und Evans blau wurden von BioMérieux bezogen und TGF stammt von Sigma.

EKIN rekonstruierte menschliche Haut:

Rekonstruierte menschliche Haut von Episkin (Ekin kit) besteht aus einer dermalen Stütze geformt aus Collagen. Die Keratinocyten wurden von dieser Stütze entfernt. Nach der Entfernung der Keratinocyten und einer Differenzierung in einer Luft-exponierten Kultur, konnte ein Äquivalent zur menschlichen Haut erhalten werden.

Test Substanzen

TGF beta wurde als positiv-Kontrolle verwendet.

Als Testsubstanz diente eine Zubereitung bestehend aus: Propylen Glycol, Ruscus Aculeatus Wurzel Extrakt, Centella Asiatica Extrakt, Panthenol, Wasser, Calendula Officinalis Blumen Extrakt, hydrolysierte Hefeproteine, Aesculus Hippocastanum Axtrakt, und Ammonium Glycyrrhizate in veränderlichen Gewichtsanteilen.

Die rekonstruierte menschliche Haut wurde täglich über drei Tage mit 0,01 % dieser Zubereitung oder mit 10 ng/ml TGF beta topisch behandelt. Dies entspricht einer Gesamtmenge an Zubereitung von 100 Mikroliter pro rekonstruierter Haut. Nach dieser Behandlung wurden umgehend Biopsien genommen und bis zur Auswertung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Immunohistochemie

Zehn Mikrometer der Kryostat Section (in flüssigem Stickstoff gelagerte Biopsie) wurden auf Objektträger aus Glas fixiert und in kaltem Aceton für zehn Minuten gelagert. Anschließend wurde die Section in PBS gewaschen und an der Luft getrocknet.

Die Section wurde eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Antikörper anti-plectin in einer Lösung von 1/150 inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Section mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) – konjugiertem anti-mouse Antikörper für 45 min in einer Lösung von 1/40 inkubiert. Negativ-Kontrollen wurden erhalten durch Weglassen des ersten Antikörpers. Nach dem ausgedehnten Waschen mit PBS wurden die immunbehandelten Sectionen für 10 min. mit Evans blau behandelt. Mit einem konvokalen Lasermikroskop der Firma Zeiss wurden die Sectionen begutachtet.

Quantifizierung

Die durch das konvokale Lasermikroskop erhaltenen Bilder wurden konvertiert und analysiert durch eine mathematisch morphologische Software (Quantimet Q500, Leica). Die Ergebnisse wurden dargestellt als Prozent der rekonstruierten Hautoberfläche belegt durch Plectin (FITC) belegt wird.

Ergebnisse

	Kontrolle ohne Behandlung	TGF beta	Zubereitung der Testsub- stanz
% des Plectin-Gehaltes in der Haut-Section	4,16	21,43	37,9

Ohne Behandlung konnte nur eine geringe Expression der DEJ – Komponente Plectin in der rekonstruierten Haut nachgewiesen werden.

Die topische Behandlung mit der Zubereitung der Testsubstanzen haben eine starke Erhöhung der Expression von Plectin in der rekonstruierten Haut gezeigt. Die positiv-Kontrolle TGF zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Expression an Plectin in der rekonstruierten Haut.

Beispiel 2: Perlecan Expression

Reagentien:

Monoklonale Antikörper Anti-perlecan und sekundäre Antikörper an Fluorescein Isothiocyanat FITC konjugierte anti-mouse Antikörper IgG wurden erhalten von der Firma Tebu und Clinisciences. PBS (Phosphat buffered saline pH 7,2) und Evans blau wurden von BioMérieux bezogen und TGF stammt von Sigma.

Menschliche primäre Fibroblasten Kultur

Eine Zellsuspension an menschlichen Fibroblasten wurde hergestellt durch Standard Verdauung von Collagenase von menschlicher Dermis erwachsener Personen, erhalten durch plastische Chirurgie. Die Fibroblasten wurden gezogen auf Glassschalen mit Inkubationskammern und wuchsen im Kulturmedium bis zum Zusammenfluss.

Test Substanzen

TGF beta wurde als positiv-Kontrolle verwendet.

Als Testsubstanz diente ein hydrolysiertes Hibiscus Esculentus Extrakt.

Die menschlichen Fibroblasten wurden kultiviert in Gegenwart von 0,1 % der Testsubstanz oder in Gegenwart von 10 ng/ml TGF beta in dem Kulturmedium über 6 Tage. Anschließend wurde die Perlecan Expression durch Immunocytochemie ausgewertet.

Immunohistochemie

Die Fibroblasten Kultur in den Glasschalen wurden in kaltem Methanol für 10 min fixiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Fibroblasten Kulturen eine Stunde bei 37°C mit dem monoklonalen Antikörper anti-plectin in einer Lösung von 1/150 inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Section mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) – konjugiertem anti-mouse Antikörper für 45 min in einer Lösung von 1/40 inkubiert. Negativ-Kontrollen wurden erhalten durch Weglassen des ersten Antikörpers. Nach dem ausgedehnten Waschen mit PBS wurden die immunobehandelten Sectionen für 10 min. mit Evans blau behandelt. Mit einem konvokalen Lasermikroskop der Firma Zeiss wurden die Sectionen begutachtet.

Quantifizierung

Die durch das konvokale Lasermikroskop erhaltenen Bilder wurden konvertiert und analysiert durch eine mathematisch morphologische Software (Quantimet Q500, Leica). Die Ergebnisse wurden dargestellt als Prozent der Fläche der Fibroblasten Kultur belegt durch Perlecan (FITC) belegt wird.

Ergebnisse

	Kontrolle ohne Behandlung	TGF beta	Testsubstanz
% des Perlecan Gehaltes in der Fibroblasten Kultur	1,28	25,07	8,0

Ohne Behandlung konnte nur eine geringe Expression der DEJ – Komponente Perlecan in der Fibroblasten Kulturnachgewiesen werden.

Die Behandlung mit der Testsubstanz haben eine Erhöhung der Expression von Perlecanin in der Fibroblasten Kultur gezeigt. Die positiv-Kontrolle TGF zeigte ebenfalls eine Erhöhung der Expression an Perlecan in der Fibroblasten Kultur.

Die Ergebnisse aus Beispiel 1 und Beispiel 2 zeigen, dass die Testsubstanzen, (Produkte von Laboratoires Sérobiologiques) die Expression von Plectin und Perlecan erhöhen können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur kosmetischen Behandlung zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal-Epidermal-Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Zubereitung, enthaltend mindestens eine Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, topisch aufträgt.
2. Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zur Verbesserung und/oder zum Schutz der Dermal-Epidermal-Junctions der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut.
3. Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz der Haut gegen Alterung.
4. Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut gegen toxische Umwelteinflüsse.
5. Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel zum Schutz der Haut, Kopfhaut und Schleimhaut gegen UV-Lichteinwirkung.
6. Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel gegen oxidativen Stress.
7. Verwendung einer Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, zur Herstellung kosmetischer Mittel gegen Haarausfall und zur Verbesserung der Haareigenschaften.
8. Verwendung gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz ein Pflanzenextrakt ist, welcher eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt.
9. Verwendung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Extrakt aus der Pflanze *Pisum sativum*, *Ruscus Aculeatus*, *Centella asiatica*, *Calendula Officinalis*, *Aesculus Hippocastanum*, und/oder *Hibiscus esculentus* als gewonnen ist.
10. Verwendung gemäß mindestens einem der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Substanz ausgewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird von Mannitol,

Cyclodextrin, Hefeextrakt, Panthenol, Propylen Glycol, Ammonium Glycyrrhizat und Dinatriumsuccinat, niedrigmolekularen Peptiden.

11. Kosmetische Zubereitungen, enthaltend mindestens eine Substanz, welche eine Modulation von Plectin/HD1 und/oder Entactin/Nidogen und/oder Perlecan bewirkt, und UV-Lichtschutzfaktoren und/oder Antioxidantien.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09809

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K7/00 A61K7/48 A61K38/39

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 199 50 020 A (HENKEL KGAA) 19 April 2001 (2001-04-19) page 4, line 29 - line 34 ---	1-8, 10, 11
X	WO 99 62481 A (HEUSELE CATHERINE ;BONTE FREDERIC (FR); DUMAS MARC (FR); GUERLAIN) 9 December 1999 (1999-12-09) the whole document ---	1-8, 10, 11
X	WO 99 62480 A (BONTE FREDERIC ;DUMAS MARC (FR); PERRIER PIERRE (FR); DIOR CHRISTI) 9 December 1999 (1999-12-09) the whole document ---	1-9, 11
X	WO 96 40047 A (YU RUEY J ;SCOTT EUGENE J VAN (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) the whole document ---	1-9

-/-

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 December 2003

Date of mailing of the international search report

29/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Filali, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/09809

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 13302 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 15 November 1990 (1990-11-15) the whole document -----	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09809

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19950020	A	19-04-2001	DE 19950020 A1	19-04-2001
			AU 1022501 A	30-04-2001
			WO 0128536 A2	26-04-2001
			EP 1221948 A2	17-07-2002
WO 9962481	A	09-12-1999	FR 2779059 A1	03-12-1999
			DE 1082098 T1	05-07-2001
			EP 1082098 A1	14-03-2001
			ES 2156846 T1	01-08-2001
			WO 9962481 A1	09-12-1999
			JP 2002516838 T	11-06-2002
			US 2003059484 A1	27-03-2003
			US 6471972 B1	29-10-2002
WO 9962480	A	09-12-1999	FR 2779058 A1	03-12-1999
			EP 1079797 A2	07-03-2001
			WO 9962480 A2	09-12-1999
			JP 2002516837 T	11-06-2002
			US 6641848 B1	04-11-2003
WO 9640047	A	19-12-1996	US 5686489 A	11-11-1997
			AU 701517 B2	28-01-1999
			AU 6035796 A	30-12-1996
			CA 2223324 A1	19-12-1996
			EP 0831767 A1	01-04-1998
			WO 9640047 A1	19-12-1996
WO 9013302	A	15-11-1990	AU 5654990 A	29-11-1990
			WO 9013302 A1	15-11-1990

INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09809

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 A61K7/00 A61K7/48 A61K38/39

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DE 199 50 020 A (HENKEL KGAA) 19. April 2001 (2001-04-19) Seite 4, Zeile 29 - Zeile 34 ---	1-8,10, 11
X	WO 99 62481 A (HEUSELE CATHERINE ;BONTE FREDERIC (FR); DUMAS MARC (FR); GUERLAIN) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) das ganze Dokument ---	1-8,10, 11
X	WO 99 62480 A (BONTE FREDERIC ;DUMAS MARC (FR); PERRIER PIERRE (FR); DIOR CHRISTI) 9. Dezember 1999 (1999-12-09) das ganze Dokument ---	1-9,11
X	WO 96 40047 A (YU RUEY J ;SCOTT EUGENE J VAN (US)) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) das ganze Dokument ---	1-9
	-/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

18. Dezember 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

29/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Filali, S

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09809

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 90 13302 A (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL) 15. November 1990 (1990-11-15) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 03/09809

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19950020 A	19-04-2001	DE 19950020 A1	19-04-2001
		AU 1022501 A	30-04-2001
		WO 0128536 A2	26-04-2001
		EP 1221948 A2	17-07-2002
WO 9962481 A	09-12-1999	FR 2779059 A1	03-12-1999
		DE 1082098 T1	05-07-2001
		EP 1082098 A1	14-03-2001
		ES 2156846 T1	01-08-2001
		WO 9962481 A1	09-12-1999
		JP 2002516838 T	11-06-2002
		US 2003059484 A1	27-03-2003
		US 6471972 B1	29-10-2002
WO 9962480 A	09-12-1999	FR 2779058 A1	03-12-1999
		EP 1079797 A2	07-03-2001
		WO 9962480 A2	09-12-1999
		JP 2002516837 T	11-06-2002
		US 6641848 B1	04-11-2003
WO 9640047 A	19-12-1996	US 5686489 A	11-11-1997
		AU 701517 B2	28-01-1999
		AU 6035796 A	30-12-1996
		CA 2223324 A1	19-12-1996
		EP 0831767 A1	01-04-1998
		WO 9640047 A1	19-12-1996
WO 9013302 A	15-11-1990	AU 5654990 A	29-11-1990
		WO 9013302 A1	15-11-1990